动 物 学 研 究 2001, Oct. 22 (5): 392~396 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

两个金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 基因的克隆与序列报道

查红光 张 云[①]
(中国科学院昆明动物研究所 昆明 650223)

摘要：从广西产金环蛇(*Bungarus fasciatus*)毒腺中抽提总 RNA，经 mRNA 纯化后构建了金环蛇毒腺 cDNA 文库。根据已发表的眼镜蛇科蛇毒磷脂酶 A_2 基因序列中的保守区设计探针筛选克隆，得到 2 个磷脂酶 A_2 基因。测定两者序列，其 cDNA 的阅读框均为 435 bp，编码 145 个氨基酸的磷脂酶 A_2 前体，其中包括 27 个氨基酸组成的信号肽，118 个氨基酸组成的成熟蛋白质；两者均属于第一类磷脂酶 A_2，其等电点经计算机软件推算分别为 7.96 和 7.95。根据序列比较分析，这 2 个磷脂酶 A_2 基因所编码的蛋白质序列结构均区别于已报道的金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2，是 2 个新的金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2，分别命名为金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 Ⅰ(Bf-PLA_2 Ⅰ)和金环蛇磷脂酶 A_2 Ⅱ(Bf-PLA_2 Ⅱ)。

关键词：金环蛇；磷脂酶 A_2；cDNA；序列分析
中图分类号：Q959.6+2，Q71 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2001)05-0392-05

磷脂酶 A_2(phospholipase A_2，EC 3.1.1.4，简称为 PLA_2)能催化甘油磷脂的第 2 位脂酰键的水解，生成溶血磷脂和脂肪酸。PLA_2 按照它的来源可以分为外分泌性磷脂酶 A_2(sPLA_2)和胞质性磷脂酶 A_2(cPLA_2)(Kramer *et al.*, 1986)，其中 sPLA_2 是小分子量的水溶性蛋白质(一般分子量都在 14 kDa 左右)，主要存在于动物的胰脏和蛇的毒液中。PLA_2 在蛇毒中有着广泛的来源，但其含量和活性在不同蛇毒中有较大的差异(van den Bergh *et al.*, 1989)。由于蛇毒 PLA_2 具有特殊的药理、毒理和生化性质，且热稳定性好，因此它也是蛇毒中研究较为广泛深入的一种酶。蛇毒 PLA_2 除了基本的酶活性外，还具有多种生物活性，例如：神经毒性(Bouchier *et al.*, 1991)、肌肉毒性(Diaz *et al.*, 1991)、溶血活性(Babu & Gowda, 1991)和抑制血小板聚集活性(Chen *et al.*, 1987)等。在 1 种蛇毒中往往含有 PLA_2 的多种同功酶，PLA_2 这种多样性对于在捕食时通过相互之间或者与其他的蛇毒蛋白质发生协同作用具有重要意义。金环蛇(*Bungarus fasciatus*)属于眼镜蛇科(Elapidae)环蛇属(*Bungarus*)，分布于中国南部及东南亚地区。PLA_2 在金环蛇蛇毒中有很高的含量。迄今为止，已有 6 种不同的 PLA_2 蛋白质的全序列被测定(Lu & Lo, 1978, 1981; Liu *et al.*, 1988, 1989, 1992)，但对其基因序列却未见报道。本文首次报道金环蛇蛇毒 PLA_2 的基因，而且这 2 个 PLA_2 基因所编码的蛋白序列结构均区别于已报道的金环蛇蛇毒 PLA_2，是 2 个新的金环蛇蛇毒 PLA_2，对深入研究蛇毒 PLA_2 结构与功能的关系、基因进化等具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材 料

金环蛇采自广西南宁。mRNA 分离纯化试剂盒为 PROMEGA 公司的产品、SuperScript™ 质粒 cDNA 文库构建试剂盒为 GIBCO/BRL 公司的产品、Max DH101B 感受态宿主菌为 Takara 公司的产品、PCR 反应试剂盒为 Takara 公司的产品，其他试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 金环蛇毒腺 cDNA 文库构建

金环蛇断头后，立刻取出毒腺并匀浆。用异硫

收稿日期：2001-05-23；修改稿收到日期：2001-06-14
基金项目：中国科学院"十五"计划预研项目资助课题
本文的核酸序列已提交美国 Genebank 数据库，号码 AF387594，AF387595
①通讯联系人，E-mail：zhangy@mail.kiz.ac.cn.

氰酸胍热酚法抽提总 RNA，经 oligo(dT)n 亲和柱纯化得到 mRNA。cDNA 文库构建方法主要参照 GIBCO/BRL 公司所提供的文库构建试剂盒说明书进行。逆转录所纯化的 mRNA 合成 cDNA，选择大于 300 bp 的双链 cDNA 组份，5′端接上 *Sal* Ⅰ 接头，酶解后得到5′端为 *Sal* Ⅰ，3′端为 *Not* Ⅰ 的双链 cDNA 并克隆至 pSPORT 1 载体上。含有外源 DNA 的载体转化到 Max DH101B 宿主菌中，共得到 4×10^4 个转化子。

1.3　寡核苷酸的合成

根据已发表的眼镜蛇科蛇毒 PLA_2(Danse *et al*.，1990；Danse，1994；Pan *et al*.，1994a，b)保守的5′端和3′端非翻译区序列，设计并于自动 DNA 合成仪(ABI，381A 型)上合成正向引物 P5：5′－TTGTGTCTCCCTCTTAGGAG－3′；反向引物为 P3：5′－GCCTCTCAAATATCATTGGC－3′，用于 cDNA 文库筛选过程中的 PCR 反应。

1.4　阳性克隆的筛选

利用 PCR 法进行文库中 PLA_2 基因的筛选(Israel，1993)。用所合成的 1 对寡核苷酸 P5 和 P3 作为 PCR 反应的引物，反应条件为 92℃ 变性 15 s，55℃退火 25 s，72℃延伸 25 s，共进行 35 个循环，最后 72℃保温 10 min。首先滴定构建的细菌 cDNA 文库，然后用含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基稀释至适当的细菌浓度(大约 500 个细菌/mL)，用于首轮筛选；在 96 孔培养板上按 8×8 方式铺板(共 64 孔，每孔 100 μL)，37℃培养过夜。按行、列分别合并细菌培养液，有 16 个样品进行 PCR 鉴定。交叉阳性孔细菌样品被稀释至约 30 个细菌/mL，同上方法继续在 96 孔培养板上按 8×8 方式铺板培养进入第 2 轮筛选。由此出现的交叉阳性孔细菌样品在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养，挑选单克隆进行 PCR 鉴定，确认的阳性克隆用于测序。

1.5　DNA 测序

采用 Sanger 双脱氧 DNA 测序法，对阳性克隆进行双向测序，阅读校正测序结果。采用 Clustal V 软件进行序列计算机比较分析。

2　结果与讨论

2.1　金环蛇 PLA_2 基因的克隆及序列

通过上述 PCR 方法筛选所构建金环蛇毒腺 cDNA 文库中的 PLA_2 基因，获得多个 PCR 反应阳性克隆。以位于 pSPORT 1 载体上的 T_7 和 SP_6 寡核苷酸作为测序引物，对阳性克隆进行双向测序分析，结果获得 2 种不同的 PLA_2 基因，cDNA 序列及推导出的氨基酸序列见图 1(a，b)。这 2 个 cDNA 的阅读框均为 435 bp，编码 145 个氨基酸的磷脂酶 A_2 前体，其中包括 27 个氨基酸组成的信号肽，118 个氨基酸组成的成熟蛋白质，分别命名为 Bf-PLA_2 Ⅰ 和 Bf-PLA_2 Ⅱ。

2.2　序列分析与讨论

目前文献中虽然没有金环蛇蛇毒 PLA_2 的基因序列报道，但已有 6 个金环蛇蛇毒 PLA_2 的蛋白质化学法测定的氨基酸序列报道，分别为金环蛇蛇毒毒素Ⅴ－3(toxin Ⅴ-3)、金环蛇蛇毒毒素Ⅴ－2(toxin Ⅴ-2)、金环蛇蛇毒毒素Ⅳ(toxin Ⅳ)、金环蛇蛇毒碱性磷脂酶 A_2 Ⅹ(basic PLA_2 Ⅹ)、金环蛇蛇毒中性磷脂酶 A_2 Ⅲ(neutral PLA_2 Ⅲ)和金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 同系物(PLA_2 homolog)(Lu & Lo，1978，1981；Liu *et al*.，1988，1989，1992)。将 Bf-PLA_2 Ⅰ 和 Bf-PLA_2 Ⅱ 的氨基酸序列与现已发表的上述金环蛇蛇毒 PLA_2 蛋白质的全序列进行比较(图 2)，可得以下结果：①本文所报道的 2 个 cDNA 序列均为蛇毒 PLA_2 的完整基因，可编码完整的蛇毒 PLA_2 蛋白质前体，其中包括 27 个氨基酸组成的信号肽和 118 个氨基酸组成的成熟酶蛋白，与已知金环蛇蛇毒 PLA_2 大小完全一致。且其中均含有保守的 14 个半胱氨酸(形成 7 对二硫键)和对酶活性重要的第 48 位天门冬氨酸(Arni & Ward，1996)。这也表明经 cDNA 文库筛选出的基因序列是完全可靠的。②由于我们是根据眼

表 1　金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 Ⅰ 和 Ⅱ 与其他已知金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 蛋白质序列同源性比较

Table 1　Amino acid sequence identities among *Bungarus fasciatus* phospholipase A_2s Ⅰ and Ⅱ and other known *Bungarus fasciatus* venom phospholipase A_2s

金环蛇蛇毒	蛋白质序列同源性/% (percentage of amino acid identity)	
	磷脂酶 A_2 Ⅰ (PLA_2 Ⅰ)	磷脂酶 A_2 Ⅱ (PLA_2 Ⅱ)
磷脂酶 A_2 Ⅰ (PLA_2 Ⅰ)	—	91.5
磷脂酶 A_2 Ⅱ (PLA_2 Ⅱ)	91.5	—
毒素Ⅴ－3(toxin Ⅴ-3)	95.8	90.7
毒素Ⅴ－2(toxin Ⅴ-2)	94.9	91.5
毒素Ⅳ(toxin Ⅳ)	89.0	94.9
碱性磷脂酶 A_2 Ⅹ (basic PLA_2 Ⅹ)	84.7	79.7
中性磷脂酶 A_2 Ⅲ (neutral PLA_2 Ⅲ)	61.0	58.5
磷脂酶 A_2 同系物(PLA_2 homolog)	58.5	59.3

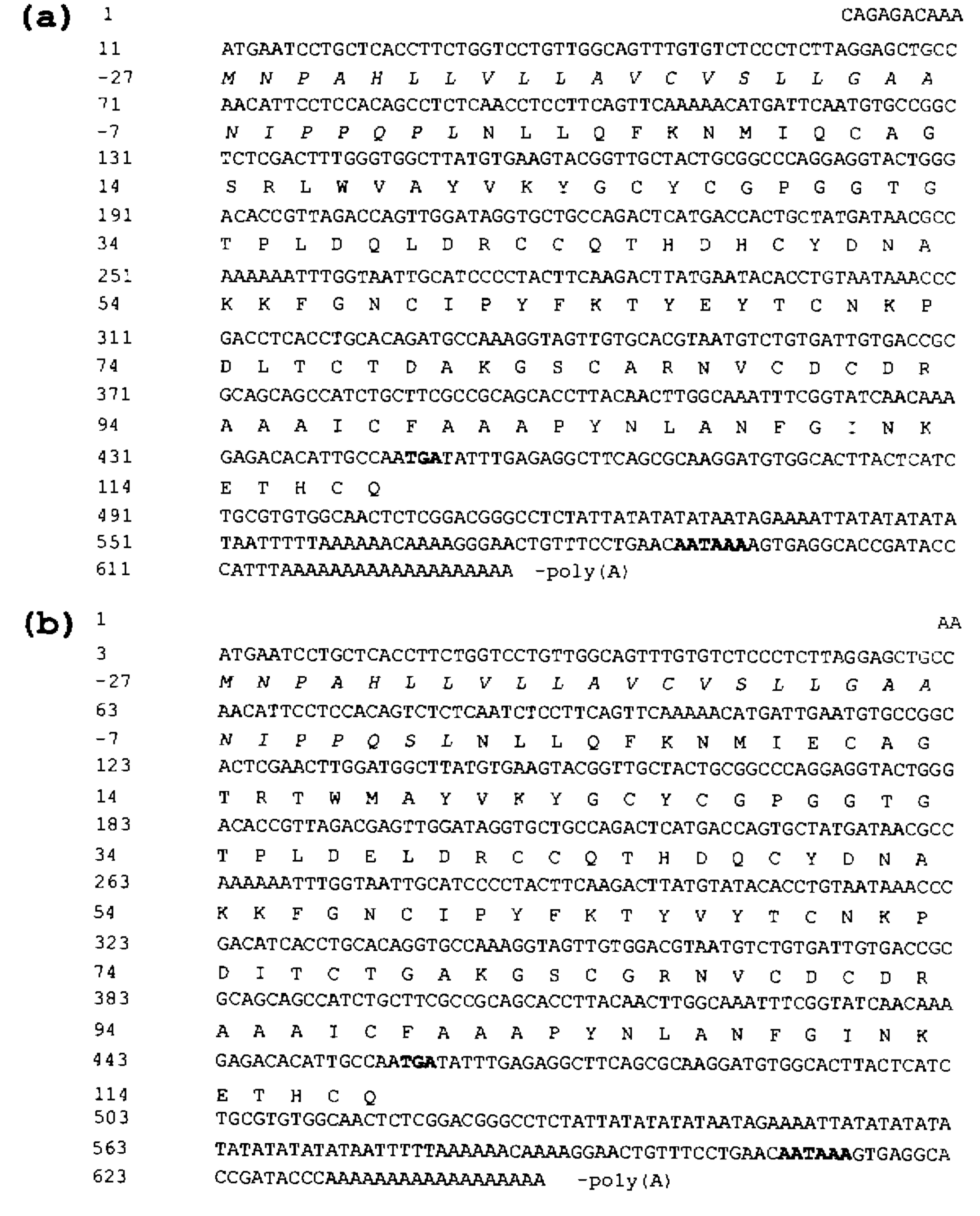


图 1 金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 Ⅰ和Ⅱ完整的 cDNA 序列及推定的氨基酸序列

Fig.1 Complete nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of novel phospholipase A_2s Ⅰ and Ⅱ from *Bungarus fasciatus*

(a)磷脂酶 A_2 Ⅰ(PLA_2 Ⅰ);(b)磷脂酶 A_2 Ⅱ(PLA_2 Ⅱ)

核酸序列方向为正向(由 5'端到 3'端),核酸序列下为相应的氨基酸序列,信号肽序列以斜体字母表示,氨基酸序列的编号以成熟蛋白 N 端为 1 起始。加 poly(A)信号及终止密码子均以黑体字母突出显示(The nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction. Beneath the nucleotide sequence is the deduced amino acid sequence encoded by the open reading frame. The putative signal sequence is shown in italics. The polyadenylation signal and stop codon are shown in bold type)。

```
磷脂酶 A2 I(PLA2 I)                    (1)   NLLQFKNMIQCAGSRLWVAYVKYGCYCGPGGTGTPLDQLDRCCQTHDHCYDNAKKFGNCI
磷脂酶 A2 II(PLA2 II)                  (1)            E   T T M                   E         Q
毒素 V-3(Toxin V-3)                    (1)
毒素 V-2(Toxin V-2)                    (1)                                                   Q
毒素 IV (Toxin IV)                     (1)     Y      E   T T L                   E
碱性磷脂酶 A2 X (Basic PLA2 X)         (1)     Y          T       N      K  S   V                  R  K N
中性磷脂酶 A2 III (Neutral PLA2 III)   (1)     F          T S TD  S      K  S   V   L   KV  D  GD E IPK K
磷脂酶 A2 同系物(PLA2 homolog)         (1)    MV   S V  TST P LD  D   N OI        E        AN  TE R  PE A

磷脂酶 A2 I(PLA2 I)                    (61)  PYFKTYEYTCNKPDLTCTDAKGSCARNVCDCDRAAAICFAAAPYNLANFGINKETHCQ
磷脂酶 A2 II(PLA2 II)                  (61)        V       I   G     G
毒素 V-3(Toxin V-3)                    (61)                I         G T                        D  K
毒素 V-2(Toxin V-2)                    (61)                I         G T                        D  K
毒素 IV (Toxin IV)                     (61)    L   V       I   G     G T                           K
碱性磷脂酶 A2 X (Basic PLA2 X)         (61)        S      N   R    T E F                   S      K   K
中性磷脂酶 A2 III (Neutral PLA2 III)   (61)    Y   S D SEGK   KADNDE  AFI N   V      G    DN  M DSK R
磷脂酶 A2 同系物(PLA2 homolog)         (61)    Y   S   SGGTI  NADNDE  AS  N   T  L   G    QN  DVDL  R
```

图 2　金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 Ⅰ和Ⅱ与其他已知金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 蛋白质序列比较

Fig.2　Alignment of the amino acid sequences of novel phospholipase A_2s Ⅰ and Ⅱ from *Bungarus fasciatus* (Bf-PLA_2 Ⅰ, Bf-PLA_2 Ⅱ) and those of other known *Bungarus fasciatus* venom phospholipase A_2s

图中氨基酸符号采取单字符表示，括号内数字为蛋白质序列(One letter abbreviation of amino acid residues are used. The numbering is based on the sequence of each protein)。

镜蛇科中已知的 PLA_2 基因序列 5′端和 3′端非翻译区设计筛选克隆的 PCR 引物，并从我们所构建的金环蛇毒腺 cDNA 库中筛选得到了 2 个 PLA_2 基因；这也提示眼镜蛇科 PLA_2 基因 5′端和 3′端非翻译区在进化过程中是相当保守的，为今后对蛇毒 PLA_2 基因分子进化的研究提供了一些客观资料。③Bf-PLA_2 Ⅰ和 Bf-PLA_2 Ⅱ与已知全序列的 6 种金环蛇蛇毒磷脂酶 A_2 有较高的同源性，最高可达 95.8%、最低也有 58.5%(表 1)，但没有完全相同的。由此说明即使是在单一的蛇种之中，磷脂酶 A_2 也具有较多的变异体。金环蛇蛇毒 PLA_2 在分类上均属于第一类磷脂酶 A_2(David & Edward, 2000)，且已知已分离鉴定的各种 PLA_2 在酶活性及其他生化性质上有较大的差异(Chang *et al*., 1983; Gong *et al*., 1989; Liu *et al*., 1992)。我们的工作首次报道了金环蛇蛇毒 PLA_2 的 cDNA 序列，并发现了 2 种新的金环蛇蛇毒 PLA_2 的变异体，这无疑为今后研究蛇毒 PLA_2 基因的多样性、基因的进化以及眼镜蛇科的系统发育提供了更多的信息，对深入研究蛇毒 PLA_2 结构与功能的关系、蛇毒中毒机制等也具有重要的意义。

参 考 文 献

Arni R K, Ward R J, 1996. Phospholipase A_2-A structure review[J]. *Toxicon*, **34**: 827－841.

Babu A S, Gowda T V, 1991. Effects of chemical modification on enzymatic and toxicological properties of phospholipases A_2 from *Naja naja naja* and *Vipera russelli* snake venoms [J]. *Toxicon*, **29**: 1251－1262.

Bouchier C, Boulain J C, Bon C *et al*, 1991. Analysis of cDNA encoding the two subunit of crotoxin, a phospholipase A_2 neurotoxin from rattlesnake venom: The acid nonenzymatic subunit derived from a phospholipase A_2-like precursor[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1088**: 401－408.

Chang W C, Lee M L, Lo T B, 1983. Phospholipase A_2 activity of long-chain cardiotoxins in the venom of the banded krait (*Bungarus fasciatus*)[J]. *Toxicon*, **21**: 163－165.

Chen Y C, Maraganore J M, Reardon I *et al*, 1987. Characterization of the structure and function of three phospholipases A_2 from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas[J]. *Toxicon*, **25**: 401－409.

Danse J M, 1994. Nucleotide sequence encoding for non-toxic phospholipase-A_2 from *Bungarus multicinctus* [J]. *Nucleic Acids Res*., **18**: 4608.

Danse J M, Toussaint J L, Kempf J, 1990. Nucleotide sequence encoding beta-bungarotoxin A_2-chain from the venom glands of *Bungarus multicinctus* [J]. *Nucleic Acids Res*., **18**: 4609.

David A S, Edward A D, 2000. The expanding superfamily of phospholipase A_2 enzymes: classification and characterization [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**: 1－19.

Diaz C, Gutierrez J M, Lomonte B *et al*, 1991. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A_2, anticoagulant and myotoxic activities [J]. *Biochim. Biophys. Acta*., **1070**: 455－460.

Gong Q H, Wieland S J, Fletcher J E *et al*, 1989. Effect of a phospholipase A_2 with cardiotoxin-like properties, from *Bungarus fasciatus* snake venom, on calcium-modulated potassium currents [J]. *Toxicon*, **27**: 1339－1349.

Israel D, 1993. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries[J]. *Nucleic Acids Res.*, **21**: 2627 – 2631.

Kramer R M, Cheeani G C, Deykin A *et al*, 1986. Solubilization and properties of Ca^{2+}-dependent human platelet phospholipase A_2 [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **878**: 394 – 403.

Liu C S, Chang C S, Leu H L *et al*, 1988. The complete amino-acid sequence of basic phospholipase A_2 in the venom of *Bungarus fasciatus* [J]. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**: 1227 – 1233.

Liu C S, Leu H L, Chang C S *et al*, 1989. Amino acid sequence of a neutral phospholipase A_2(Ⅲ) in the venom of *Bungarus fasciatus* [J]. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**: 257 – 261.

Liu C S, Kuo P Y, Chen J M *et al*. 1992. Primary structure of an inactive mutant of phospholipase A_2 in the venom of *Bungarus fasciatus* (banded krait)[J]. *J. Biochem.*, **112**: 707 – 713.

Lu H S, Lo T B, 1978. Complete amino acid sequence of a new type of cardiotoxin *Bungarus fasciatus* venom[J]. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **12**: 181 – 183.

Lu H S, Lo T B, 1981. Complete amino acid sequences of two cardiotoxin-like analogues from *Bungarus fasciatus* (banded krait) snake venom [J]. *Toxicon*, **19**: 103 – 111.

Pan F M, Chang W C, Chiou S H, 1994a. cDNA and protein sequences coding for the precursor of phospholipase A_2 from Taiwan cobra, *Naja naja atra* [J]. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **33**: 187 – 194.

Pan F M, Yeh M S, Chang W C *et al*, 1994b. Sequence analysis and expression of phospholipase A_2 from Taiwan cobra[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**: 969 – 976.

van den Bergh C J, Slotboom A J, Verheij H M *et al*, 1989. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A_2 and their importance for enzymatic activity[J]. *J. Cell Biochem.*, **39**: 379 – 390.

Cloning of cDNAs Encoding Two Novel Phospholipase A_2s from *Bungarus fasciatus*

ZHA Hong-Guang ZHANG Yun[①]

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*)

Abstract: The total mRNA was prepared and purified from the venom glands of snake *Bungarus fasciatus*. A cDNA library of the venom glands was then constructed using reverse transcription. Two cDNAs encoding two novel phospholipase A_2, named as *Bungarus fasciatus* phospholipase A_2 Ⅰ (Bf-PLA_2 Ⅰ) and *Bungarus fasciatus* phospholipase A_2 Ⅱ (Bf-PLA_2 Ⅱ) respectively, were screened out by polymerase chain reaction and sequenced. Both cDNAs have an open reading frame of 435 bp, encoding a 145 amino acid phospholipase A_2 precursor composed of a 27 amino acid signal peptide followed by 118 amino acid mature protein. The two cloned phospholipase A_2 belong to Group Ⅰ phospholipase A_2. Their primary structures are different from known *Bungarus fasciatus* phospholipase A_2s.

Key words: *Bungarus fasciatus*; Phospholipase A_2; cDNA; Sequence analysis

①Corresponding author: Fax, 86 – 871 – 5191823; Tel, 86 – 871 – 5194279; email, zhangy@mail.kiz.ac.cn